

Polimer-lijek konjugati. III. Razvoj konjugata poli[*N*-(2-hidroksipropil)]metakrilamida

B. Zorc i R. Banek

Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

KUI 7/98

Prispjelo 1. listopada 1997.
Prihvaćeno 10. studenoga 1997.

U radu je opisana priprava poli[*N*-(2-hidroksipropil)]metakrilamida i srodnih kopolimera te priprava konjugata HPMA kopolimera s različitim ljekovitim tvarima (proteini: inzulin, tripsin, kimotripsin, kimotripsinogen, acetilkolin-esteraza, cjepiva; citostatici: adriamicin, daunomicin, puromicin, melfalan, sarkolizin, doksorubicin, fotosenzibilizatori; antibiotici: penicilini; protuupalna sredstva: 5-aminosalicilna kiselina). Dan je pregled bioloških pokusa nužnih za procjenu mogućnosti njihove primjene u farmaciji i medicini. Jedan od opisanih konjugata, poli[*N*-(2-hidroksipropil)]metakrilamid-doksorubicin, zadovoljio je sve zahtjeve u pretkliničkim pokusima i pokusima prve faze kliničkih ispitivanja pa se s pravom očekuje i njegova registracija kao lijeka.

Uvod

U literaturi su kao nosači ljekovitih tvari u polimer-lijek konjugatima predloženi različiti prirodni i sintetski polimeri¹. Među njima su i mnogobrojni esteri metakrilne kiseline i *N*-supstituirani akrilamidi, odnosno metakrilamidi. Nakon ispitivanja biokompatibilnosti i toksičnosti kao najinteresantniji i najperspektivniji polimer izabran je poli[*N*-(2-hidroksipropil)]metakrilamid, poli(HPMA), čiji će konjugat s doksorubicinom vjerovatno uskoro biti registriran kao lijek. S obzirom da poli(HPMA) zadovoljava mnoge zahtjeve koji se traže od polimernog nosača u ovom radu dan je pregled literaturnih podataka o njemu, od sinteze do pokusa *in vivo*.

Priprava i biološka istraživanja poli[*N*-(2-hidroksipropil)]metakrilamida i kopolimera

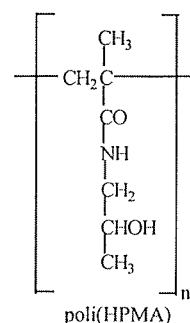
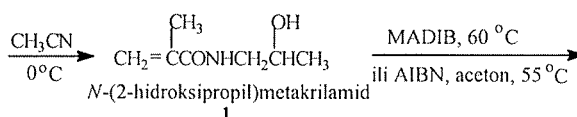
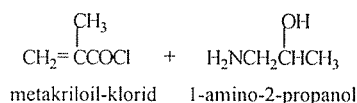
Sinteza poli(HPMA) opisana je 1971. godine². Iz metakriloil-klorida i 1-amino-2-propanola priređen je najprije odgovarajući amid, *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamid (HPMA, **1**), koji je zatim pod-

vrgnut polimerizaciji uz inicijator 2,2'-azobis(metilizobutirat) (MADIB) (shema 1).

Zatim je proučavana kinetika radikalne polimerizacije *N*-(2-hidroksipropil)-metakrilamida, tj. utjecaj otapala (H₂O i DMF), koncentracije monomera i inicijatora na stupanj polimerizacije^{3,4}. Određeni su i parametri za kopolimerizaciju s metilmetakrilatom i stirenom. Priređeni su polimeri prosječne relativne molekulske mase 2.5 do 47.5 × 10⁵. Ako se kao otapalo upotrijebi aceton, polimer se taloži iz reakcijske smjese. Ta reakcija se izvodi na nešto nižoj temperaturi (55 °C) uz 2,2-azo-bis(izobutironitril) (AIBN) kao inicijatorom polimerizacije.

Frakcioniranim taloženjem metanolne otopine polimera acetonom, priređene su frakcije čije su prosječne relativne molekulske mase određene metodom raspršivanja svjetlosti⁵. Iz grafa ovisnosti viskoznosti otopina polimera o relativnoj molekulskoj masi u rasponu od 25 × 10³ do 5 × 10⁶ određeni su parametri za Mark-Houwinkovu jednadžbu ($K = 1.1 \times 10^{-4}$, $a = 0.67$).

U literaturi je opisana priprava nekoliko *p*-nitrofenilnih estera *N*-metakriloilaminokiseline i nji-



MADIB = 2,2'-azo-bis(metilizobutirat)
AIBN = 2,2'-azo-bis(izobutironitril)

S h e m a 1 – Sinteza poli(HPMA)

S c h e m e 1 – Synthesis of poly(HPMA)

hovitih kopolimera s HPMA⁶. Mjerena je brzina reakcije monomernih i polimernih estera s različitim aminima (model reakcije za uvođenje ljekovite tvari sa slobodnom amino skupinom). Ustanovljeno je da aminoliza monomernih estera ide brže nego polimernih. To znači da je u ovom konkretnom slučaju bolje najprije vezati ljekovitu tvar na monomer, pa zatim njega polimerizirati. Uvođenjem *p*-nitrofenilne skupine (Np) na bočne lance poli(HPMA) kopolimera povećava se reaktivnost matičnog polimera jer sam poli(HPMA) ima slabo reaktivne hidroksilne skupine.

Nakon sinteze poli(HPMA) započeta su opsežna biološka istraživanja. Prvo je proučavan njegov utjecaj na krvni sustav, rađeni su testovi biokompatibilnosti, toksičnosti i imunološki testovi za sam polimer, polazne monomere i fragmente polimera koji nastaju cijepanjem u organizmu^{7,8}.

Imunološki testovi su rađeni na polimerima s dinitrofenilnom skupinom kao haptenom (haptenu je mala molekula koja sama po sebi nije antigen, ali može reagirati s odgovarajućim antitijelima i uzrokovati stvaranje antitijela kada je povezana na veće antigene molekule). Proučavan je utjecaj relativne molekulске mase HPMA kopolimera i udjela dinitrofenila na imunološki odgovor *in vitro* (humani limfociti) i *in vivo* (miševi)⁹. Zaključeno je da povećanje oba faktora vodi do jače imunološke reakcije.

Poznato je da se poli(HPMA) dugo zadržava u organizmu (iako ne trajno), najviše u slezeni, limfnim čvorovima i bubrezima, dok u mišićima i mozak uopće ne prodire. Znači da se akumulira uglavnom u imunološki aktivnim organima¹⁰. Postoje indikacije da polimeri općenito stimuliraju fagocitozu i da budu uhvaćeni od makrofaga koji su na taj način spriječeni u reakciji s antigenima, što ukazuje da polimeri mogu utjecati na imunološki odgovor organizma¹¹. Da bi se to potvrdilo praćen je učinak poli(HPMA) na vrijeme preživljavanja transplantata kože na miševima i štakorima. Dokazano je da jednokratna *i.v.* primjena polimera značajno produžava to vrijeme, dok višekratna primjena nema dodatni učinak. U radu se raspravlja o mogućem mehanizmu imunosupresivnog učinka, ali nije razjašnjen.

Stupanj hidrolize veze između polimera i ljekovite tvari može se kontrolirati promjenom duljine

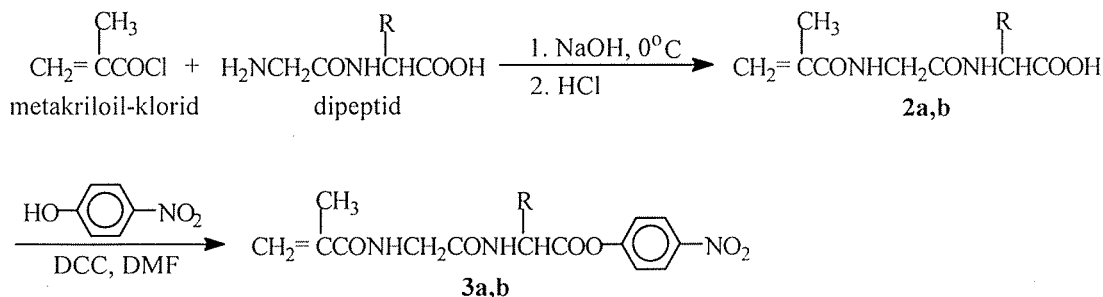
i vrste bočnog lanca. Poznato je da se mnogi oligopeptidi mogu razgraditi djelovanjem enzima u lizosomima. Zbog toga su sintetizirani polimerni prolijekovi na bazi HPMA s različitim peptidnim bočnim lancima koji se razlikuju u broju i redoslijedu aminokiselina^{12,13}. Kao terminalne aminokiseline kojima završava bočni lanac, a na koje se veže ljekovita tvar, odnosno model ljekovite tvari, odabrane su L-fenilalanin i L-leucin jer se u *in vivo* uvjetima odcjepljuju^{14,15}. Da bi se bolje razumio mehanizam razgradnje u lizosomima, polimerni prolijekovi su inkubirani s pojedinačnim cisteinskim (tiol) proteinazama (katapsin B, L i H)¹⁶. Neke oligopeptidne sekvence cijepaju se s najmanje dva enzima. Prvo se od polimernog nosača odcjepljuje oligopeptid s vezanom ljekovitom tvari, a zatim se djelovanjem aminopeptidaza i/ili dipeptidilpeptidaza (npr. katapsina C) oslobađa ljekovita tvar. Na temelju svih tih rezultata zaključeno je da je moguće kontrolirati razgradnju kopolimera HPMA *in vivo*¹⁷.

U literaturi je opisana priprava aktiviranih kopolimera *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida s *p*-nitrofenilnim esterima *N*-metakriloilglicil-L-leucina (**3a**), *N*-metakriloilglicil-L-fenilalanina (**3b**), *N*-metakriloil-ε-aminokaproil-L-leucina (Acap = ε-aminokaproil) (**7a**) i *N*-metakriloil-ε-aminokaproil-L-fenilalanina (**7b**), odnosno kopolimera **8-12**¹³.

Esteri *p*-nitrofenola s *N*-metakriloilglicil-L-leucinom (**3a**) i *N*-metakriloilglicil-L-fenilalaninom (**3b**) priređeni su iz metakriloil-klorida i odgovarajućeg dipeptida. Dobiveni produkti su zatim esterificirani s *p*-nitrofenolom u prisutnosti *N,N'*-dicihloheksilkarbodiimida (DCC) (shema 2). Esteri **7a** i **7b** priređeni su reakcijom *p*-nitrofenilnog estera *N*-metakriloil-ε-aminokapronske kiseline (**4**) i siliranog L-leucina (**5a**), odnosno L-fenilalanina (**5b**) u prisutnosti imidazola kao katalizatora te esterifikacijom nastalih produkata **6a** i **6b** *p*-nitrofenolom (shema 3).

Kopolimeri **8-12** pripremljeni su taložnom radikalnom polimerizacijom *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida (**1**) s monomerima **3a**, **3b**, **4**, **7a** ili **7b** u acetonu na 50 °C (shema 4).

Polimeri **8-12** karakterizirani su sadržajem monomera, graničnom viskoznošću i konstantom aminolize *tert*-butilaminom¹³. Ako se za aminolizu upo-

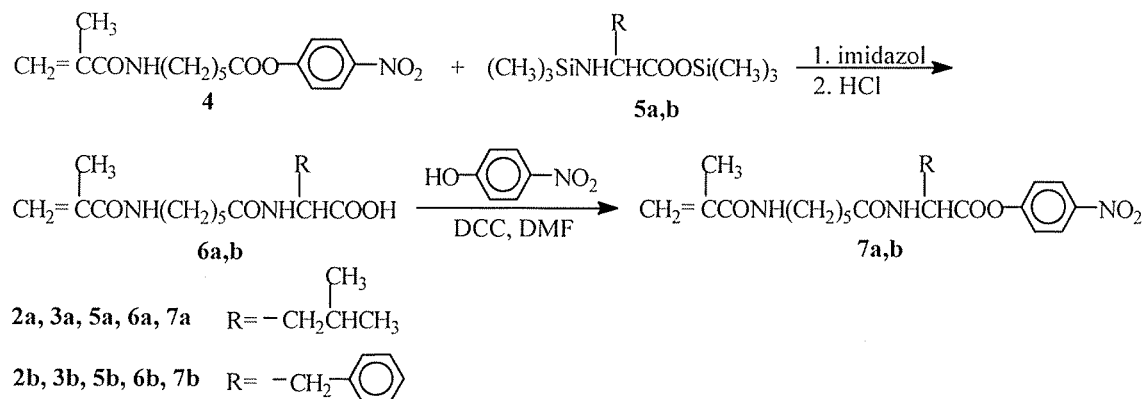


S h e m a 2 – Priprava monomera **3a** i **3b**

S c h e m e 2 – Synthesis of monomers **3a** and **3b**

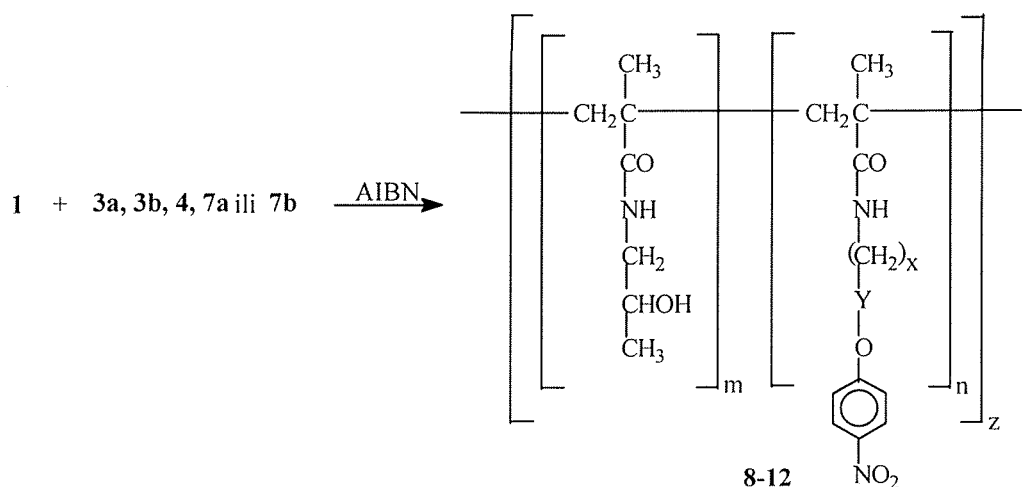
tri jebe diamini, moguće su tri reakcije: a) reakcija dvaju susjednih aktivnih estera s istim diaminom (ciklizacija), b) reakcija aktivnog estera s diaminom i c) reakcija dvaju aktivnih estera iz različitih la-

naca s istim diaminom (umrežavanje) (shema 5). Ishod reakcije ovisi o molarnim omjerima reaktanta. Uz veliki suvišak amina prevladava reakcijski put b).



S h e m a 3 – Priprava monomera **7a** i **7b**

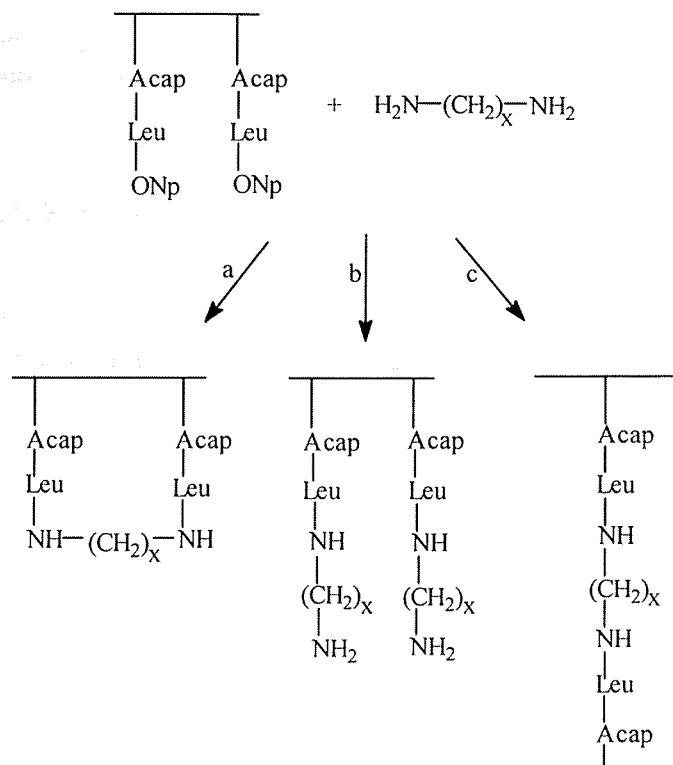
S c h e m e 3 – Synthesis of monomers **7a** i **7b**



monomer	X	Y	kopolimer
3a	1	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	8
3b	1	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	9
4	5	—CO—	10
7a	5	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	11
7b	5	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	12

S h e m a 4 – Priprava kopolimera **8-12**

S c h e m e 4 – Synthesis of copolymers **8-12**

Np = *p*-nitrofenilAcap = ϵ -aminokaproil

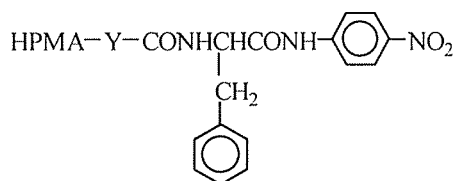
S h e m a 5 – Aminoliza aktiviranih polimera diaminima

S c h e m e 5 – Aminolysis of activated polymers with diamines

Istraživan je tijek umrežavanja kopolimera *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida s divinilnim spojevima (etilen-bis-metakrilamidom odnosno metilen-bis-akrilamidom) i različitim diaminima. Ispitvana je reakcija umrežavanja 1,6-diamino-heksanom, 1,3,5-triakriloilheksahidrotriazinom, ditirozilheksametilendiaminom i difenilalanilheksametilendiaminom^{13,18-21}. Priređeni umreženi produkti su morfološki karakterizirani i određena im je sposobnost bubrenja. U sljedećem radu proučavan je

odnos između strukture tako umreženih poroznih kopolimera i njihove sposobnosti adsorpcije različitih proteina²². Kopolimeri s *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidnim monomernim jedinicama pogodniji su za adsorpciju zbog manje mogućnosti denaturacije i dodatnih interakcija.

Načinjen je niz vodotopljivih kopolimera na bazi HPMA koji na bočnom lancu nose L-fenilalanin-*p*-nitroanilid kao kromogeni supstrat za kimotripsin (slika 1)¹². Taj enzim cijepa vezu na karboksil-



Y	% cijepanja
Gly	77
Gly-Gly	100
Gly-Gly-Gly	100
Acap	100
Gly-Acap-Gly	100

Gly = HNCH_2CO
 Acap = $\text{HN}(\text{CH}_2)_5\text{CO}$

Slika 1 – Utjecaj pobočnog lanca na enzimsko odcjepljivanje *p*-nitroanilinaFig. 1 – Side chain influence on enzymatic cleavage of *p*-nitroaniline

nom kraju *N*-supstituiranog L-fenilalanina. Tako oslobođen *p*-nitroanilin (NAP) može se kvantitativno mjeriti spektrofotometrijski. Istraživan je utjecaj kemijske strukture i duljine bočnog lanca na brzinu enzimske hidrolize. Pronađeno je da lanac mora biti duži od 6 atoma te da se s dužih lanaca supstrat lakše cijepa. Najlakše se cijepa lanac s ϵ -aminokaproilnom skupinom, čak lakše nego lanac s nekoliko jedinica glicina.

Utjecaj duljine bočnog lanca na brzinu enzimskog odcjepljenja *p*-nitroanilina slobodnim i na poli(HPMA) kopolimere imobiliziranim α -kimotripsinom detaljno je proučavan²³. Bočni lanac imao je strukturu Gly-X-Y-NAP, gdje je Gly kratica za glicin, NAP kratica za *p*-nitroanilin, X može biti glicin, alanin, β -alanin, valin, leucin, izoleucin i fenilalanin, a Y fenilalanin ili tirozin. Dokazana je veća osjetljivost na djelovanje enzima kod kopolimera s duljim bočnim lancem. U nastavku istraživanja priređene su varijante gornjih kopolimera čiji bočni lanac pored već navedenih L-aminokiselina sadrži i D-fenilalanin, te lanci: Gly-Gly-Phe-Y (Y = Phe ili Tyr); U-Gly-Val-Phe (U = Gly, Ala); Gly-Phe-W (W = Ala, Gly, D-Phe); Gly-Phe-Ala-U²⁴. Ti polimeri su umreženi pomoću diamina, a zatim podvrgnuti enzimskoj hidrolizi α -kimotripsinom. Diskutiran je utjecaj steričkih i strukturnih faktora. Zaključeno je da se netopljivi umreženi kopolimeri cijepaju samo ako sadrže oligopeptidni bočni lanac s barem četiri aminokiseline.

Dok se pod utjecajem kimotripsina *p*-nitroanilin gotovo uvijek odcjepljuje s bočnih lanaca (ali različitim brzinom), s lizosomskim enzimima jetre štakora cijepa se samo s nekih kopolimera (4 od 22), a najviše ako je bočni lanac Acap-Phe²⁵. U istom radu promatran je i utjecaj pH vrijednosti na stupanj enzimske hidrolize. Optimalni pH za odcjepljenje Acap-Phe-4-nitroanilida je između 5,75 i 6,5.

Za praćenje stabilnosti veze prema tripsinu priređeni su kopolimeri s bočnim lancem koji završava lizinom čija je karboksilna skupina esterificirana *p*-nitrofenolom²⁶. U *in vivo* pokusima (nakon *i.v.* primjene kod štakora) dokazano je cijepanje *p*-nitroanilina vezanog za fenilalanin ili lizin kao terminalne aminokiseline bočnih lanaca na umreženim ili neumreženim kopolimerima HPMA²⁷. Nadalje je proučavana stabilnost umreženih kopolimera na djelovanje kimotripsina (diamin za umreženje: 1,6-diamino-heksan; bočni lanac: ϵ -aminokaproil-L-leucin)²⁸. Primijećeno je neznatno smanjenje molekulske mase. Procijenjeno je da je enzimski pocijepano manje od 10 % umreženja.

Dizajnirani su kopolimeri HPMA s bočnim oligopeptidnim lancem specifično osjetljivim na lizosomske enzime katepsin L i katepsin D²⁹. S obzirom da je najmanji poznati supstrat katepsina D pentapeptid Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, priređen je polimer s takvim slijedom aminokiselina i srodnim heksapeptidom u bočnom lancu. Pogodni supstrati za katepsin L sadržavali su oligopeptidni lanac ovog slijeda: Gly-Phe-Phe-Ala, Gly-Phe-Phe-Leu,

Ala-Val-Ala i Gly-Phe-Phe-Gly. U svim kopolimerima završna aminokiselina amidirana je *p*-nitroanilinom (oslobađanje *p*-nitroanilina bilo je mjerilo stupnja hidrolize). Svaki od navedenih kopolimera inkubiran je sa smjesom lizosomskih enzima jetre štakora. Proučavan je utjecaj pH, koncentracije supstrata, reduciranog glutationa (GSH) i leupeptina (inhibitora tiol-proteinaza) na cijepanje bočnog lanca. Za djelovanje enzima nužna je prisutnost GSH. Inhibicija enzimske aktivnosti leupeptinom ukazuje na to da su u reakciju uključene tiol-proteinaze. Određeno je da je optimalni pH za cijepanje bočnog lanca između 5 i 7.

Radeni su analogni pokusi s kopolimerima koji u bočnim lancima imaju peptide osjetljive na cijepanje katepsinom B iz goveđe slezene³⁰. Korištena su tri tipa kopolimera: a) HPMA kopolimeri s *p*-nitroanilinom na kraju peptidnog lanca, b) topljivi dvolančani HPMA kopolimeri povezani peptidnim mostom i c) hidrofilni umreženi gelovi. Proučavani su odnosi strukture kopolimera i njihove osjetljivosti na enzim. Dokazana je važna uloga katepsina B u razgradnji navedenih supstrata.

Ulazak kopolimera HPMA procesom pinocitoze praćen je na kulturi stanica žumanjčane vrećice štakora. Bočni lanci kopolimera su prethodno markirani izotopom ¹²⁵I da bi se moglo pratiti njihovo cijepanje u lizosomima. Ulazak kopolimera u stanice i cijepanje u lizosomima može se inhibirati 2,4-dinitrofenolom. S druge strane leupeptin nema učinka na proces pinocitoze, a u različitom stupnju inhibira razgradnju u lizosomima, ovisno o strukturi bočnog lanca.

Topljivi kopolimeri umreženi ditirozilheksametilendiaminom, Tyr-NH(CH₂)₆NH-Tyr, frakcionirani su u pet frakcija s prosječnom relativnom molekulskom masom (*M_r*) od 34 000 do iznad 400 000, da bi se mogao pratiti utjecaj *M_r* na proces pinocitoze *in vitro*²⁰. Dok proces pinocitoze ovisi o *M_r* (u stanice žumanjčane vrećice brže ulaze polimeri niže, a u stanice tankog crijeva produkti više *M_r*), dotle proces biorazgradnje u lizosomima nije ovisan o *M_r*. Nadalje, praćen je utjecaj *M_r* na koncentraciju kopolimera u plazmi i na distribuciju u tijelu nakon *i.p.*, *s.c.* i *p.o.* primjene³¹. Dobiveni su sljedeći rezultati: a) da bi se spriječilo prebrzo izlučivanje urinom iz organizma, kopolimeri bi trebali imati dovoljno veliku *M_r*, oko 100 000, b) ulazak kopolimera u stanice *in vivo* je relativno spor proces, c) nakon *i.p.* i *s.c.* primjene kopolimer prelazi u druge odjeljke, tj. ne zadržava se na mjestu aplikacije, d) nakon peroralne primjene dolazi do razgradnje umreženja.

Da bi se proučio utjecaj načina primjene kopolimera na njegovu farmakokinetiku priređeni su kopolimeri umreženi difenilalanilheksametilendiaminom, uz Gly-Gly peptidni bočni lanac, te tirozinamidski i galaktozaminski ostatak²¹. Praćena je njihova sudbina *in vivo* (štakori). Dokazano je da prisutnost galaktozaminskog ostatka usmjerava ulazak kopolimera u hepatocyte poslije *i.v.*, *i.p.* i *s.c.* primjene, ali ne i nakon oralnog davanja, što upu-

čuje na utjecaj načina primjene na distribuciju polimera. Peroralna primjena ubrzava prolaz umreženog kopolimera iz želuca u tanko crijevo i ujedno pospješuje interakciju s intestinalnom mukozom. Uočeno je da u organizmu dolazi do cijepanja umreženja, što rezultira izlučivanjem polimernih lanaca niže M_r .

Sljedeći zadatak bio je istražiti može li se selektivno povećati ulazak kopolimera pinocitozom u određene stanice³². Dobro je poznata uloga ugljikohidrata u sustavu prepoznavanja glikoproteina koji ulaze u stanicu procesom pinocitoze. Zbog toga su načinjeni kopolimeri HPMA koji u bočnom lancu nose radioaktivnim jodom markirani tirozin kao model ljekovite tvari i različite aminoheksoze. Aminošećeri su spojeni s osnovnim lancem preko peptidnog bočnog lanca. Markiranje izotopom joda ¹²⁵I omogućilo je praćenje sudbine »ljekovite tvari«. Pronađeno je da samo kopolimer s galaktozaminskim ostatkom prelazi brzo iz krvnog optoka u jetru te da se »ljekovita tvar« intracelularno oslobađa. Nakon toga načinjeni su polimeri s različitim udjelom galaktozaminskih ostataka (1.0 do 11.6 mol %)³³. Udio galaktozaminskih ostataka mora biti barem 4.0 % da bi se postiglo značajnije nakupljanje polimera u jetri. Polimeri s najvećim udjelom (8–11 mol %) brzo stižu u jetru. Razdvajanjem hepatocita od neparenhimskih stanica dokazano je da većina polimera ulazi pinocitozom u hepatocite, bez prethodnog vezanja na staničnu membranu. Dokazano je da polimer ulazi u sekundarne lizosome gdje se pod utjecajem enzima cijepa na produkte manje M_r koji zatim izlaze kroz membranu lizosoma u citoplazmu. Sve to dokazuje da su nužni uvjeti za ciljanu terapiju zadovoljeni: veza polimer-lijek je stabilna do ulaska u lizosome, a unutar njih se cijepa. Oslobodena ljekovita tvar zatim prolazi kroz membranu lizosoma i dospjeva u citoplazmu.

Poznato je da se na membranama hepatocita nalaze specifični receptori za galaktozu. Da bi se mogli identificirati ekstrahepatički sustavi za prepoznavanje galaktoze, sintetizirani su jodom markirani HPMA kopolimeri s vrlo visokim sadržajem galaktozamina³⁴. Uočeno je njegovo intenzivno nakupljanje u masnom tkivu.

Uvođenje galaktozamina i drugih aminošećera u kopolimer provedeno je aminolizom aktiviranih kopolimera **8-12** odgovarajućim aminošećerom. Moguć je i drugi sintetski pristup¹⁶. Prvo je načinjen monomer metakrilne kiseline koji je esterificiran galaktozom čije su sekundarne alkoholne skupine zaštićene acetonom. Tako nastala 1.2:3.4-di-*O*-izopropiliden-6-metakriloil- α -galaktopiranoza kopolimerizirana je s HPMA, a zatim su uklonjene zaštitne skupine. Kopolimerizacija ta dva monomera dopušta ugradnju i do 99 mol % galaktoznih jedinica (1 mol % ostavljen je za ugradnju markiranog *N*-metakriloil-tirozinamida).

Uvođenjem tirozinamidnog ostatka, bilo izravno na osnovni polimerni lanac ili preko bočnog lanca (Gly-Gly-Tyr-NH₂), povećava se hidrofobnost

spoja, što rezultira povećanjem nespecifične adsorptivne pinocitoze³⁵. Proces pinocitoze se povećava s udjelom Tyr-NH₂ ostataka do 10 mol %, a intenzivno se povećava kod još većih koncentracija. Može se zaključiti da se ne smije vezati prevelika količina hidrofobnih komponenata na nosač te da je općenito optimalni udio ljekovite tvari u polimer-lijek konjugatu do 10 mol %, čime se smanjuje mogućnost nespecifične interakcije.

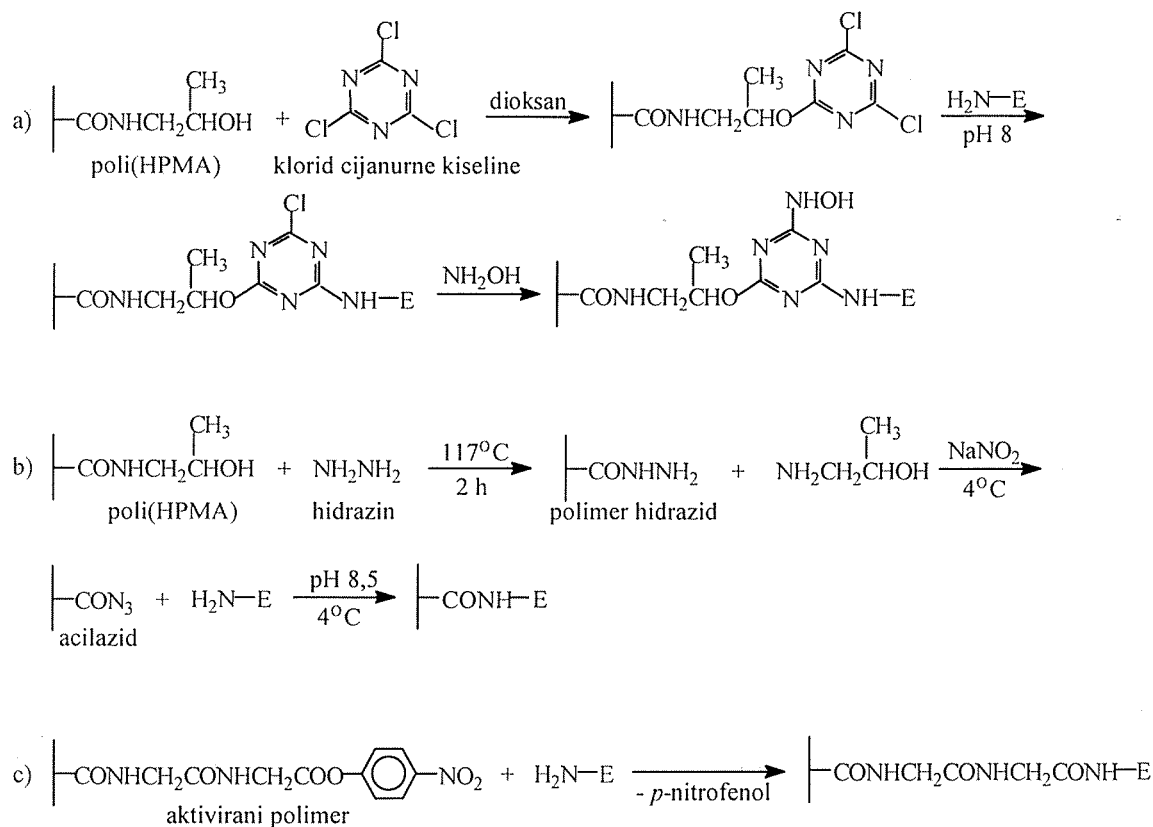
Objedinjujući prethodna zapažanja, načinjen je polimer prosječne M_r između 26 000 i 47 000 koji sadrži i galaktozaminski i tirozinamidski ostatak³⁶. »Prepoznavanje« galaktozaminskog ostatka od određenih vrsta stanica nije moguće ako je on povezan direktno na osnovni polimerni lanac, već je nužan bočni lanac. Nadalje je pokazano da uvođenje kationskih ostataka, npr. trimetilamonij-kloridnih ostataka u HPMA kopolimere, značajno povećava vezanje polimera na stanice³⁷.

Prije sinteze prvog poli(HPMA)-lijek konjugata načinjen je konjugat s *p*-nitroanilinom kao modelom ljekovite tvari vezane preko peptidnog bočnog biorazgradljivog lanca³⁸. Ti polimerni konjugati stvaraju s vodom micele u kojima je *p*-nitroanilin orijentiran prema unutrašnjosti, a hidrofilni dio prema van, što otežava pristup enzima i oslobađanje »ljekovite tvari«. Asocijacijski broj i kompaktnost micela zavise o udjelu hidrofobnih komponenata, koncentraciji polimera i temperaturi.

Priprava i biološka evaluacija konjugata HPMA kopolimera s ljekovitim tvarima

Jedna od prvih ljekovitih tvari vezanih na poli(HPMA) bio je inzulin³⁹. Dok pokušaj izravnog vezanja inzulina na homopolimer nije dao zadovoljavajuće rezultate, vezanje preko dipeptidnog bočnog lanca bilo je uspješno. Prvo je načinjen kopolimer HPMA s *p*-nitrofenilnim esterom *N*-metakriloil-glicilglicina (MA-Gly-Gly-ONp). Esterske skupine tako pripremljenog kopolimera aktivno su mjesto koje reagira sa slobodnim amino skupinama inzulina. Variranjem reakcijskih uvjeta dobiveni su produkti s različitim udjelom inzulina (najviše 60%) i različitim raspodjelom relativnih molekulskih masa. Razdvajanje vezanog od nevezanog inzulina postignuto je na koloni Sephadexa G-75. Preliminarna biološka testiranja na hipoglikemički učinak pokazala su slabiju aktivnost vezanog od slobodnog inzulina.

Goveđi α -kimotripsin imobiliziran je kovalentnim vezanjem na poli(HPMA) i kopolimer HPMA s *p*-nitrofenilnim esterom metakriloiliranog glicilglicina⁴⁰. Imobilizacijom enzima na polimerni nosač nije se promijenila njegova aktivnost prema niskomolekulskim supstratima, a povećala se termostabilnost. Osim toga smanjila se i autoliza enzima. Vezanje kimotripsina (E) na polimer provedeno je na tri načina pomoću: a) klorida cijanurne kiseline (shema 6a); b) hidrazida (shema 6b); c) aktivnog estera (shema 6c).



E = enzim

S h e m a 6 – Imobilizacija kimotripsina na polimer

S c h e m e 6 – Immobilisation of chymotrypsin on polymer

U metodi a) hidroksilna skupina polimera reagira s jednim atomom klora iz klorida cijanurne kiseline. Nastali produkt zatim reagira s amino skupinom enzima (drugi atom klora). U posljednjem reakcijskom koraku je treći atom klora supstituiran hidroksilamino skupinom. U metodi b) poli(HPMA) je pomoću hidrazin hidrata prvo preveden u polimer hidrazid, koji je zatim u reakciji s natrij-nitritom preveden u odgovarajući acilazid. Na taj način je dobiven aktivirani polimer koji reagira s amino skupinom kimotripsina. U trećoj metodi upotrebljena je klasična reakcija iz peptidne kemije: amidiranje karboksilne skupine aktivirane pomoću *p*-nitrofenola s amino spojem.

Vezanjem proteina na vodotopljive polimere može se značajno smanjiti njihovo antigeno djelovanje^{41,42}. Da bi se objasnio mehanizam zaštitnog učinka polimernog nosača na vezane proteine, potrebno je proučiti utjecaj nosača na protein-protein interakciju⁴³. U tu svrhu je izabran sljedeći model: na kopolimerni nosač pripravljen iz *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida i *p*-nitrofenilnog estera *N*-metakriloil-glicilglicina vezani su tripsin i kimotripsinogen. Uspoređivana je aktivnost nevezanog

tripsina i kimotripsina prema niskomolekulskim i visokomolekulskim supstratima s aktivnošću istih enzima vezanih na polimerni nosač. Katalitička aktivnost prema niskomolekulskim supstratima nije se promijenila vezanjem enzima na nosač, a aktivnost prema visokomolekulskim supstratima se značajno smanjila zbog steričkih razloga i/ili blokiranja aktivnog mjesta vezanih enzima.

Nadalje, na HPMA kopolimer je vezana acetil-kolin-esteraza⁴⁴. Uspoređivano je vrijeme preživljavanja nativnog i imobiliziranog enzima u krvnom optoku miševa te njihova otpornost na termoinaktivaciju i djelovanje proteolitičkih enzima. Dokazana je zaštitna uloga polimernog nosača. Specifična antitijela za acetikolin-esterazu strogo razlikuju vezani od nevezanog enzima.

Razmatrana je mogućnost oralne upotrebe nekih cjepiva peptidne strukture koja su u gastrointestinalnom (GI) traktu podložna enzimskom cijepanju⁴⁵. Cjepiva su imobilizirana na polimerni nosač da bi se povećala njihova stabilnost na djelovanje enzima. Na HPMA kopolimer vezani su B-lanac inzulina i V2 peptid dobiven iz humanog rinovirusa kao modeli proteina. U oba konjugata

smanjila se razgradnja peptida *in vitro* za vrijeme inkubacije s enzimima iz tankog crijeva.

Upotreba antitijela za »adresiranje«, tj. usmjerenje tvari na određena tkiva, druga je mogućnost postizanja ciljne terapije. U literaturi je potvrđena povećana pinocitoza, ali i egzocitoza za HPMA kopolimer na kojeg je vezan IgG štakora (*in vitro* pokusi)³⁶. IgG se može vezati na HPMA kopolimer na takav način da se sposobnost vezanja antitijela nije potpuno izgubila. Imunogenost antitijela vezanih na HPMA kopolimere se smanjuje, što je dokazano na primjeru humanog IgG i humanog transferina.

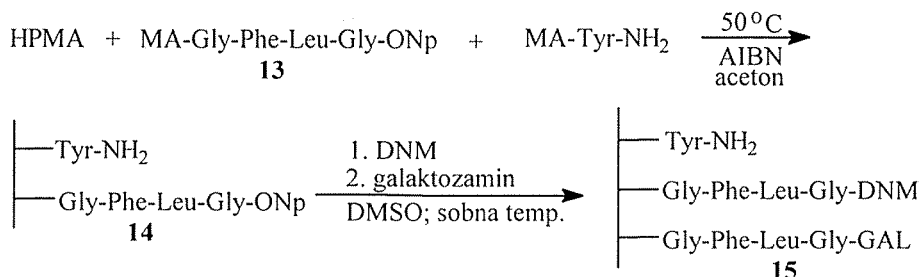
Potreba za ciljanim djelovanjem lijekovitih tvari najveća je u terapiji tumorskih oboljenja. Za sada se polimer-lijek konjugati smatraju najperspektivnijim sustavima za ciljano djelovanje jer mogu dospjeti do različitih stanica, a retikuloendotelni sustav ih ne fagocitira u većoj mjeri. Mnoge farmakološki aktivne tvari iz skupine kemoterapeutika brzo i neselektivno ulaze u sve tipove stanica, što smanjuje njihovu bioraspodjeljivost na mjestu gdje trebaju djelovati. Za razliku od njih, polimerni terapeutici se selektivno nakupljaju u tumorskim stanicama. Proces po kojem se to događa nazvan je povećana permeabilnost i učinak zadržavanja. Najprije je istraživao utjecaj M_r na nakupljanje HPMA kopolimera u tumorima *in vivo*⁴⁶. Kopolimeri s molekulsom masom većom od bubrežnog praga pokazali su brzu akumulaciju u tumorima.

Prvo je sintetiziran i farmakološki ispitan konjugat HPMA s adriamicinom⁴⁷. Ljekovita tvar je vezana na polimerni lanac preko biorazgradljivog Gly-Phe-Leu-Gly i nerazgradljivog Gly-Gly bočnog lanca. Fukozilamin ili galaktozamin su vezani za konjugat kao »targeting« (sredstvo koje usmjerava) za L1210 stanice leukemije, odnosno hepatocite. U usporedbi sa slobodnim adriamicinom njegov konjugat znatno je produžio vrijeme preživljavanja leukemičnih miševa, pokazao je manju toksičnost i različitu distribuciju. Nedvojbeno je dokazano da je za farmakološko djelovanje nužno odcjepljenje ad-

riamicina koje je moguće samo ako je bočni lanac biorazgradljiv. Terapijski učinak polimer-adriamicin konjugata na pokusnim životinjama je daleko veći od učinka slobodnog adriamicina¹⁷. Dok je vrijeme poluživota u plazmi slobodne lijekovite tvari oko 18 sati, konjugat se zadržava u plazmi oko 15 puta dulje, usprkos činjenici da se dio konjugata brzo izluči iz organizma. Tako konjugat djeluje kao odlagalište iz kojeg se lijekovita tvar polagano oslobađa. Osim toga fizičko-kemijska svojstva konjugata uzrokuju pojačano odlaganje konjugata u endotelijskim stanicama tumora. I na kraju, veći terapijski učinak konjugata može se objasniti činjenicom da tumorske stanice imaju veću sposobnost endocitoze (konjugati ulaze u stanicu pinocitozom). Nakon primjene konjugata uočena je manja koncentracija lijekovite tvari u srcu, što ukazuje na to da je konjugat manje kardiotoksičan¹⁷.

Sintetski kopolimeri HPMA testirani su kao nosači antraciklinskog antibiotika daunomicina i inhibitora sinteze proteina puromicina. Ti citostatici su vezani na osnovni lanac prosječne M_r od 17 000 do 31 000 preko nekoliko različitih bočnih peptidnih lanaca. Na bočne lance su vezani ostaci tirozinamida (povećanje hidrofobnosti) i galaktozamina ili fukozilamina (povećanje pinocitoze). Primjer sinteze jednog konjugata (**15**) prikazan je u shemi 7. Sinteza konjugata je načinjena u dva stupnja. Polimerni prekursori su pripremljeni radikalnom precipitacijskom kopolimerizacijom HPMA, *N*-metakriloliltirozinamida (MA-Tyr-NH₂) i *p*-nitrofenilnog estera *N*-metakriloliloligopeptida (**13**). U drugom stupnju načinjena je aminoliza s daunomicinom (DNM), galaktozaminom ili fukozilaminom. Udio vezanog daunomicina bio je od 6.5 do 9 %⁴⁸. Strukture konjugata prikazane su na slici 2.

Testiranje farmakološkog djelovanja konjugata rađeno je *in vitro* na stanicama leukemije miša L1210 i humanim limfoblastičnim stanicama leukemije CCRF. Farmakološki učinak (citotoksičnost) konjugata ovisio je o strukturi aminokiselinskog bočnog lanca, a najdjelotvorniji se pokazao konju-

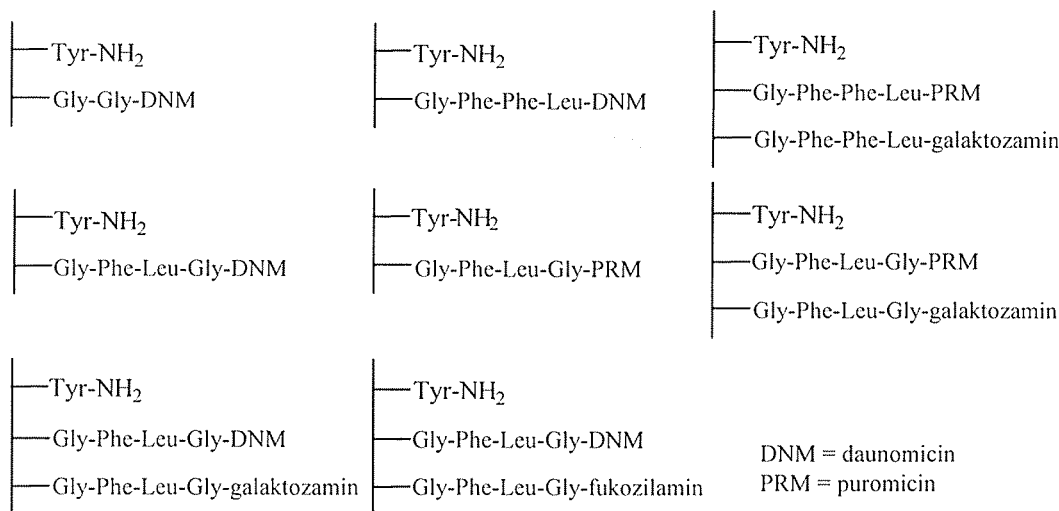


MA = metakrilolil

DNM = daunomicin

AIBN = 2,2'-azo-bis(izobutironitril)

GAL = galaktozamin



Slika 2 – Strukture polimernih konjugata daunomicina

Fig. 2 – Structure of polymeric daunomycin conjugate

gat s fukozilaminskim ostatkom. Svi konjugati su pokazali manji farmakološki učinak od slobodnog daunomicina. Zatim su miševi inokulirani sa stanicama leukemije L1210 i slobodnim daunomicinom ili istom ljekovitom tvari vezanom na polimerni nosač preko ranije navedenih bočnih lanaca⁴⁸. Konjugat s biorazgradljivim bočnim lancem Gly-Phe-Leu-Gly najviše je produljio vrijeme preživljavanja životinja, a ako je u kopolimeru prisutan i šećerni ostatak farmakološko djelovanje bilo je još izraženije. Dokazana je ovisnost farmakološkog učinka o dozi konjugata. Kopolimeri s biorazgradljivim bočnim lancem izlučuju se iz organizma fragmentirani, a Gly-Gly kopolimeri u makromolekulskom obliku. Eksperimentalne životinje toleriraju 10 puta veće doze vezanog daunomicina od nevezanog, pa je stoga njegova toksičnost znatno manja¹⁶. Da bi se ispitala mogućnost upotrebe HPMA kopolimer-daunomicin konjugata u terapiji čvrstih tumora, rađeni su eksperimenti *in vivo* na štakorima s tumorom Walker 256^{49,50}. Ponovo je konjugat pokazao veći farmakološki učinak i manju toksičnost od slobodnog daunomicina.

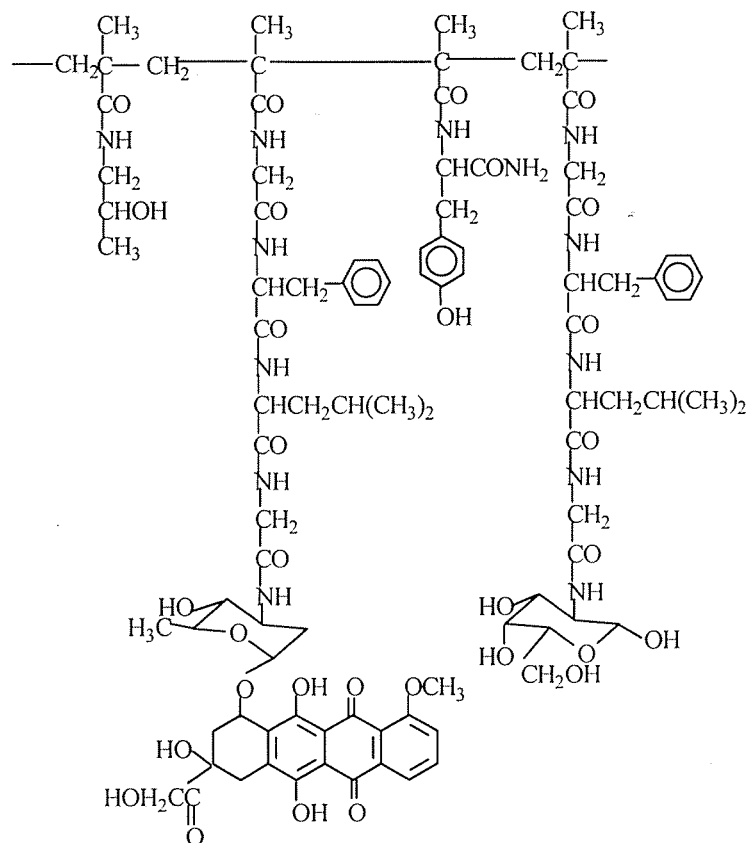
Da bi se procjenio utjecaj vrste i duljine bočnog lanca na brzinu enzimskog oslobađanja ljekovite tvari (papain i enzimi lizosoma jetre), sintetizirano je nekoliko srodnih konjugata HPMA s adriamicinom i daunomicinom s različitim oligopeptidnim bočnim lancem⁵¹. Najdjelotvornijim se pokazao konjugat s tetrapeptidnim lancem (Gly-Phe-Leu-Gly). Na brzinu cijepanja polimer-lijek veze utječe i kemijska priroda same ljekovite tvari – npr. adriamicin se brže odcjepljuje s konjugata nego daunomicin, iako su vezani preko istog bočnog lanca.

Na HPMA kopolimere vezani su i alkilirajuće antitumorske tvari – sarkolizin izopropil ester i melfalan^{52,53}.

Sintetizirano je nekoliko srodnih kopolimera HPMA s kovalentno vezanim doksorubicinom (DOX) od kojih je najdjelotvorniji polimer s tetrapeptidnim bočnim lancem Gly-Phe-Leu-Gly. Taj bočni lanac razgrađuju lizosomski enzimi čija se aktivnost povećava u metastaziranim tumorima. M_r polimernog nosača je približno 20 000, a udio ljekovite tvari u konjugatu oko 7-10 %. Načinjene su varijante tog konjugata sa i bez galaktozaminskog ostatka (4 mol %). Određena je brzina oslobađanja doksorubicina *in vitro* i *in vivo*. Testirana je i farmakološka aktivnost konjugata prema različitim vrstama tumora^{54,56-58}. Konjugati su pokazali široki spektar antitumorskog djelovanja i manju toksičnost od slobodnog doksorubicina, a nakon učestalog davanja pokusnim životinjama uzrokuju neznan imunološki odgovor⁵⁹. U *in vitro* uvjetima konjugat ne pokazuje značajnu citotoksičnost, a *in vivo* se aktivira pod utjecajem različitih bioloških faktora⁶⁰. Struktura najaktivnijeg konjugata s doksorubicinom, koji se trenutno nalazi u kliničkim ispitivanjima, prikazana je na slici 3.

Sintetizirani su nisko (LMW) i visokomolekulski (HMW) HPMA-doksorubicin konjugati s M_r od 25 000 do 94 000⁵⁷. Kopolimeri su obilježeni radioaktivnim izotopima joda što je omogućilo praćenje biodistribucije pomoću gama kamere. *In vivo* pokusi su pokazali brže uklanjanje iz peritonealne šupljine, visoku koncentraciju u bubrezima i brže izlučivanje urinom. HMW supstrati su se najviše zadržavali u cirkulaciji, slezeni i jetri.

Konjugat doksorubicina se 5–10 puta dulje zadržava u plazmi nego slobodni doksorubicin koji brzo nestaje iz cirkulacije⁵⁵. Posljedica toga je pasivna akumulacija konjugata u čvrstim tumorima. Endotelijska prevlaka krvnih žila je u normalnim tkivima neprekinuta što onemogućava prolaz makromolekula. Krvne žile u tumorima često imaju



Slika 3 – Fragment konjugata HPMA kopolimera s doksorubicinom

Fig. 3 – A part of HPMA copolymer-doxorubicin conjugate

isprekidani endotel pa makromolekule lakše prolaze kroz njih. Ako je uz to smanjena učinkovitost limfnog odvođenja, makromolekule ostaju uhvaćene u tumorskom tkivu. Sve to dovodi do poboljšanja antitumorskog djelovanja.

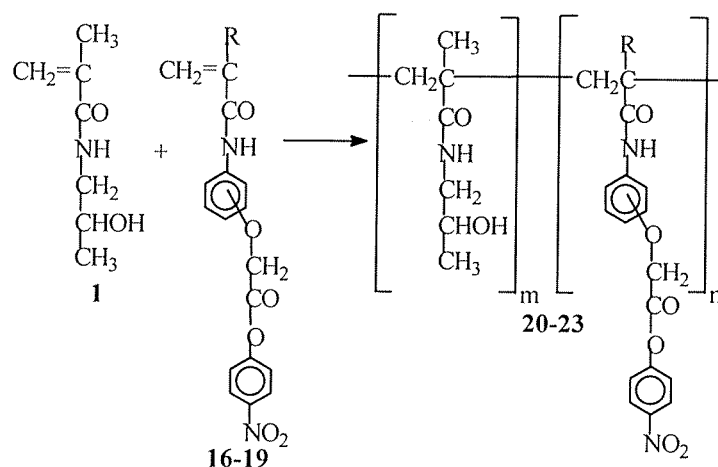
U fotodinamskoj terapiji karcinoma upotrebljavaju se fotosenzibilizirajuće tvari (fotosenzibilizatori) kao antitumorski agensi¹⁷. Fotosenzibilizatori (porfirini, ftalocijanini, purpurini, klorini, naftalocijanini, kationske boje, tetraciklini i drugi) potpuno su inertni prije izlaganja svjetlosti, a aktiviraju se zračenjem određene valne duljine što rezultira stvaranjem singletnog kisika kao vrlo reaktivne čestice. Ako ozračimo samo ciljno tkivo, samo će se u njemu aktivirati lijekovita tvar. Upotrebom konjugata koncentracija lijekovite tvari se povećala u ciljnom tkivu (dio doze je otišao i u druga tkiva), ali se lijekovita tvar aktivirala samo tamo gdje je njen učinak potreban. Time je postignut dvostruko ciljani učinak.

Kao potencijalni sustav za dvostruko ciljanu terapiju načinjen je polimerni fotosenzibilizirajući konjugat HPMA kopolimera i klorina e_6 kao predstavnika fotosenzibilizatora^{61,62}. Uspoređivana je fotodinamička aktivnost samog klorina e_6 , polimernog konjugata sa i bez anti-Thy 1.2 antitijela, te

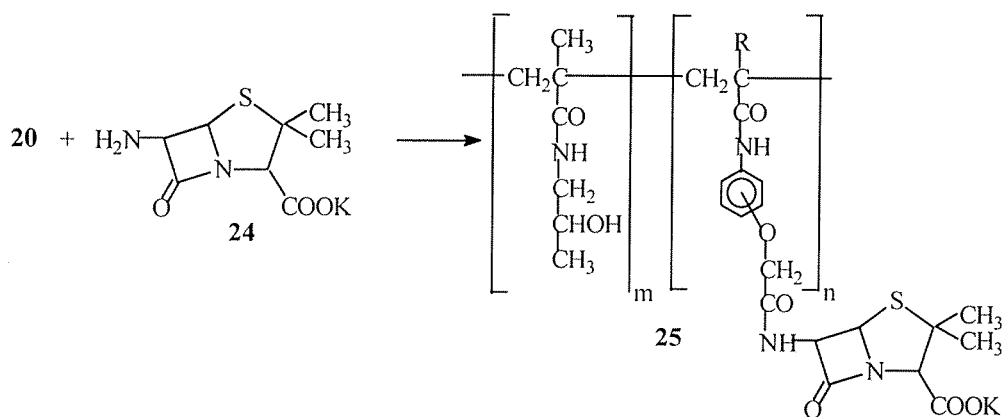
konjugata s galaktozaminom. Dok je slobodni klorin e_6 citotoksičan i u mraku i nakon ozračivanja, konjugati pokazuju citotoksičnost samo nakon iradijacije. To se može objasniti promjenom lipofilnosti klorina e_6 : dok je slobodni klorin e_6 lipofilan i dobro difundira u stanicu, konjugat je manje lipofilan, a ulazi u stanicu pinocitozom. Nakon ozračivanja nastali singletni kisik oštećuje membranu lizosoma, što dovodi do oslobađanja enzima i autolize stanice.

Ciljana terapija je osim kod citostatika važna i kod antibiotika⁶³. Proučavana je aminoliza kopolimera *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida (**1**) i *p*-nitrofenilnog estera (met)akrilolaminofenoksiotene kiseline (**16-19**) sa 6-aminopenicilanskom kiselinom (6-APK) (**24**) kao modelom penicilinskih antibiotika. Monomeri **16-19** i odgovarajući reaktivni polimeri **20-23** imaju *p*-nitrofenilnu estersku grupu u *orto* ili *para* položaju u odnosu na benzenski prsten. Sinteza konjugata **25** prikazana je na shemi 8.

Dizajniran je kopolimer za ciljanu peroralnu primjenu, pogodan za liječenje upalnih bolesti debelog crijeva^{64,65}. Taj kopolimer ima 5-aminosalicilnu kiselinu (5-ASA) vezanu preko aromatske azo veze koja se pod utjecajem reduktaza iz anaerobnih



monomer	polimer	R	izomer
16	20	CH ₃	<i>para</i>
17	21	CH ₃	<i>orto</i>
18	22	H	<i>para</i>
19	23	H	<i>orto</i>



S h e m a 8 – Struktura konjugata sa 6-aminopenicilanskom kiselinom

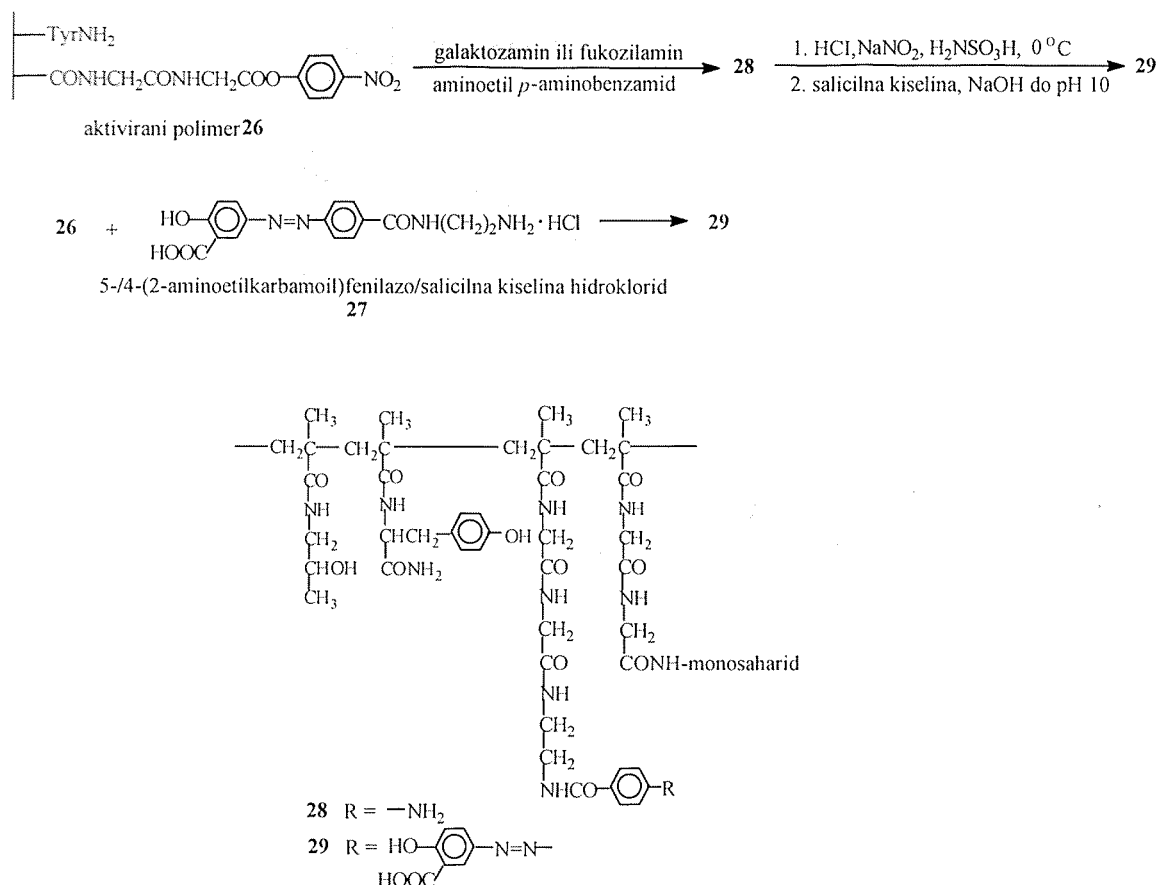
S c h e m e 8 – Structure of polymer-6-aminopenicillanic acid conjugate

bakterija cijepa isključivo u debelom crijevu. 5-ASA je djelatna komponenta sulfasalazina koji se upotrebljava za liječenje ulcerativnog kolitisa. Ako je na konjugat vezan i fukozilaminski ostatak bioadhezivnost na lektine sluznice debelog crijeva je znatno veća, a time i vrijeme zadržavanja ljekovite tvari u GI traktu. Praćeno je oslobađanje 5-ASA nakon inkubacije s ekstraktom iz slijepog crijeva štakora ili pod utjecajem *Streptococcus faecium*, uobičajene bakterije debelog crijeva te u pokusima *in vivo* na štakorima¹⁷. Stupanj cijepanja azo veze u konjugatu bio je sličan kao kod niskomolekulskih azo supstrata.

Sinteza HPMA-5-ASA konjugata opisana je u nekoliko publikacija^{64,66,67}. U prvom radu sintetiziran je aktivirani kopolimer **26** (s reaktivnim este-

rom na Gly-Gly bočnom lancu) koji je zatim aminoliziran fukozilaminom i azo derivatom salicilne kiseline **27** (priređen iz etil-*p*-amino-benzoata, salicilne kiseline i odgovarajućeg hidrazina). U drugom radu aktivirani kopolimer **26** aminoliziran je galaktozaminom i β -aminoetil *p*-aminobenzamidom. Posljednja komponenta potrebna je za uvođenje salicilne kiseline. Treći sintetski put je varijacija prethodne dvije sinteze. Monomerni MA-Gly-Gly-ONp je prvo aminoliziran s **27**, a zatim polimeriziran. Sinteza konjugata sa 5-ASA prikazana je na shemi 9.

Osim za pripravu polimer-lijek konjugata istraživana je mogućnost primjene HPMA kopolimera u drugim sustavima za kontrolirano oslobađanje ljekovitih tvari. Na primjer, pripremljeni su novi



S h e m a 9 – Sinteza konjugata sa 5-ASA za ciljano djelovanje u debelom crijevu

S c h e m e 9 – Synthesis of 5-ASA conjugate for colon-specific drug delivery

biorazgradljivi hidrogeli na bazi kopolimera HPMA i *N,O*-dimetakriloil-hidroksilamina (DMHA) pogodni za kontrolirano oslobađanje lijekovitih tvari⁶⁸. Opisana je njihova sinteza, razgradnja *in vitro* i upotreba kao matriksa za kontrolirano oslobađanje lijekovitih tvari. Proučeni su uvjeti umrežavanja i svojstva dobivenih hidrogela. Dokazana je njihova stabilnost u kiselim uvjetima i razgradnja u neutralnom (pH 7.4). Kao modeli lijekovitih tvari upotrebljeni su doksorubicin i HPMA kopolimer konjugat s doksorubicinom. Njihovo oslobađanje iz matriksa hidrogela zavisi o difuziji, razgradnji hidrogela i kombinaciji ta dva procesa.

Također su ispitivana transportna svojstva različitih *N*-supstituiranih metakrilamida, između ostalog kopolimera HPMA, mjerenjem prolaska elektrolita i saharoze kroz membranu načinjenu od odgovarajućeg umreženog polimera⁶⁹. Očito je da su HPMA kopolimeri interesantni i za farmaceutsku tehnologiju, pa je moguća njihova primjena i u tom području farmaceutskih znanosti.

Zaključak

Poli(HPMA) i njegovi kopolimeri kao vodotopljivi, biokompatibilni i netoksični spojevi pogodni su nosači lijekovitih tvari u polimer-lijek konjugatima. Struktura kopolimera može se modificirati radi povećanja lipofilnosti (uvođenjem tirozinamidnog ostatka) i selektivnosti (uvođenjem odgovarajućih monosaharidnih ostataka). Dokazano je da samo lijekovite tvari povezane na polimerni kostur preko biorazgradljivih bočnih lanaca mogu dospjeti u citoplazmu stanice i tamo ispoljiti svoje farmakološko djelovanje. S obzirom da je ciljana terapija najpotrebnija kod tumorskih oboljenja, većina konjugata sadrži neki od uobičajenih citostatika. Neki konjugati su pogodni za ciljanu peroralnu terapiju, tj. za specifično djelovanje u debelom crijevu. Mnogobrojni biološki pokusi *in vitro* i *in vivo* ukazuju na različitu distribuciju i manju toksičnost lijekovitih tvari kovalentno vezanih na polimerni nosač u usporedbi s nevezanim lijekovitim tvarima. Zbog toga se polimer-lijek konjugati danas smatra-

ju vrlo perspektivnim načinom isporuke ljekovitih tvari.

Popis kratica

List of abbreviations

Acap	– ϵ -aminokaproil
AIBN	– 2,2'-azo-bis(izobutironitril)
Ala	– alanin
6-APK	– 6-aminopenicilanska kiselina
5-ASA	– 5-aminosalicilna kiselina
DCC	– <i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DMF	– <i>N,N</i> -dimetilforamid
DMHA	– <i>N,O</i> -dimetakriloil-hidroksilamin
DNM	– daunomicin
DOX	– doksorubicin
GI	– gastrointestinalni
Gly	– glicin
GSA	– reducirani glutation
HMPA	– <i>N</i> -(2-hidroksipropil)-metakrilamid
HMW	– visokomolekulski
<i>i.p.</i>	– intraperitonealni
<i>i.v.</i>	– intravenski
Leu	– leucin
LMW	– niskomolekulski
MA	– metakriloil
MADIB	– 2,2'-azo-bis(metilizobutirat)
Nap	– <i>p</i> -nitroanilin
Np	– <i>p</i> -nitrofenil
Phe	– fenilalanin
<i>p.o.</i>	– peroralni
PRM	– puromicin
<i>s.c.</i>	– subkutani
Tyr	– tirozin
Val	– valin

Literatura

References

1. I. Kalčić, B. Zorc, *Kem. Ind.* **46** (1997) 267
2. L. Šprinc, J. Vacik, J. Kopeček, D. Lim, *J. Biomed. Mater. Res.* **5** (1971) 197
3. J. Kopeček, H. Bažilova, *Eur. Polym. J.* **9** (1973) 7
4. J. Strohalm, J. Kopeček, *Angew. Makromol. Chem.* **70** (1978) 109
5. M. Bohdanecky, H. Bažilova, J. Kopeček, *Eur. Polym. J.* **10** (1974) 405
6. P. Rejmanova, J. Labsky, J. Kopeček, *Macromol. Chem.* **178** (1977) 2159
7. J. Kopeček, L. Šprinc, D. Lim, *J. Biomed. Mater. Res.* **7**(2) (1973) 179
8. O. Benešova, L. Šprinc, K. Ulbrich, V. Plainser, *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **32** (1980) 115
9. H. Tlaskalova-Hogenova, J. Kopeček, K. Ulbrich, F. Rypaček, M. Pospíšil, *Makromol. Chem. Suppl.* **9** (1985) 137
10. J. Kalal, J. Drobnik, J. Kopeček, J. Exner, *Br. Polym. J.* **10**(2) 111
11. E. Paulska, J. Činatl, L. Korčáková, O. Šterba, J. Kopeček, A. Hrubá, J. Nezvalova, R. Stanek, *Folia Biol.* **26**(5) (1980) 304
12. J. Drobnik, J. Kopeček, J. Labsky, P. Rejmanova, J. Exner, V. Saudek, J. Kalal, *Makromol. Chem.* **177** (1976) 2833
13. J. Kopeček, *Macromol. Chem.* **178** (1977) 2169
14. H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **297** (1954) 149
15. H. Jatzkewitz, *Z. Naturforsch., Teil B*, **10** (1955) 27
16. J. Kopeček, R. Duncan, *J. Controlled Release* **6** (1987) 315
17. J. Kopeček, *J. Controlled Release* **11** (1990) 279
18. J. Kopeček, H. Bažilova, *Eur. Polym. J.* **10** (1974) 465
19. J. Vacik, Z. Pelzbauer, N. N. Kuznetsova, K. P. Papukova, L. K. Shataeva, G. V. Samsonov, J. Kalal, J. Kopeček, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **44** (1979) 1925
20. S. A. Cartlidge, R. Duncan, J. B. Lloyd, P. Rejmanova, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **3** (1986) 55
21. S. A. Cartlidge, R. Duncan, J. B. Lloyd, P. Kopečková-Rejmanova, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **4** (1987) 265
22. J. Vacik, L. K. Shataeva, G. V. Samsonov, J. Kalal, J. Kopeček, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **44** (1979) 1931
23. J. Kopeček, P. Rejmanova, V. Chytrý, *Makromol. Chem.* **182** (1981) 799
24. P. Rejmanova, B. Obereigner, J. Kopeček, *Makromol. Chem.* **182** (1981) 1899
25. R. Duncan, J. B. Lloyd, J. Kopeček, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**(1) (1980) 284
26. K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopeček, *Makromol. Chem.* **182** (1981) 1917
27. J. Kopeček, I. Cifkova, P. Rejmanova, J. Strohalm, B. Obereigner, K. Ulbrich, *Makromol. Chem.* **182** (1981) 2941
28. J. Kopeček, P. Rejmanova, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **66** (1979) 15
29. R. Duncan, H. C. Cable, J. B. Lloyd, P. Rejmanova, *Makromol. Chem.* **184** (1983) 1997
30. P. Rejmanova, J. Kopeček, J. Pohl, M. Baudys, V. Kostka, *Makromol. Chem.* **184** (1983) 200
31. S. A. Cartlidge, R. Duncan, J. B. Lloyd, P. Kopečková-Rejmanova, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **4** (1987) 253
32. R. Duncan, J. Kopeček, P. Rejmanova, J. B. Lloyd, *Biochim. Biophys. Acta* **755** (1983) 518
33. R. Duncan, L. C. W. Seymour, L. Scarlett, J. B. Lloyd, P. Rejmanova, J. Kopeček, *Biochim. Biophys. Acta* **880** (1986) 62
34. L. W. Seymour, R. Duncan, V. Chytrý, J. Strohalm, K. Ulbrich, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **16** (1991) 255
35. R. Duncan, H. C. Cable, P. Rejmanova, J. Kopeček, J. B. Lloyd, *Biochim. Biophys. Acta* **799**(1) (1984) 1
36. R. Duncan, J. B. Lloyd, P. Rejmanova, J. Kopeček, *Makromol. Chem. Suppl.* **9** (1985) 3
37. R. Duncan, J. B. Lloyd, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **27**(1) (1986) 13
38. K. Ulbrich, C. Konak, Z. Tuzar, J. Kopeček, *Makromol. Chem.* **188** (1987) 1261
39. V. Chytrý, A. Vrana, J. Kopeček, *Macromol. Chem.* **179** (1978) 329

40. A. Laane, V. Chytry, M. Haga, P. Sikk, A. Aaviksaar, J. Kopeček, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **46** (1981) 1466
41. A. Abuchowski, F. F. Davis, *Biochim. Biophys. Acta* **578** (1979) 11
42. K. V. Savoca, A. Abuchowski, T. van Es, F. F. Davis, N. C. Palczuk, *Biochim. Biophys. Acta* **578** (1979) 47
43. V. Chytry, J. Kopeček, P. Sikk, R. Sinijarv, A. Aaviksaar, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **3** (1982) 11
44. A. Laane, A. Aaviksaar, M. Haga, V. Chytry, J. Kopeček, *Makromol. Chem. Suppl.* **9** (1985) 35
45. S. M. Morgan, V. Subr, K. Ulbrich, J. F. Woodley, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* **128** (1996) 99
46. L. W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, *Eur. J. Cancer* **31A**(5) (1995) 766
47. R. Duncan, I. C. Hume, P. Kopečková, K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **10** (1989) 51
48. R. Duncan, P. Kopečková, J. Strohalm, I. Hume, J. B. Lloyd, J. Kopeček, *Br. J. Cancer* **57**(2) (1988) 147
49. J. Cassidy, G. Morrison, R. Duncan, J. Strohalm, D. Plocova, J. Kopeček, S. B. Kaye, *EORTC Pharmacology and Metabolism Group Meeting, Proceedings, Aviano, Italy, June 1988*
50. J. Cassidy, R. Duncan, G. J. Morrison, J. Strohalm, D. Plocova, J. Kopeček, S. B. Kaye, *Biochem. Pharmacol.* **38** (1989) 875
51. V. Subr, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, I. C. Hume, *J. Controlled Release* **18** (1992) 123
52. K. Ulbrich, E. I. Zacharieva, J. Kopeček, I. C. Hume, R. Duncan, *Makromol. Chem.* **188** (1987) 2497
53. R. Duncan, I. C. Hume, H. J. Yardley, P. A. Flanagan, K. Ulbrich, V. Subr, J. Strohalm, *J. Controlled Release* **16** (1991) 121
54. R. Duncan, L. W. Seymour, K. B. O'Hare, P. A. Flanagan, S. Wedge, I. C. Hume, K. Ulbrich, J. Strohalm, V. Subr, F. Spreafico, M. Grandi, M. Ripamonti, M. Farao, A. Suarato, *J. Controlled Release* **19** (1992) 331
55. R. Duncan, K. Ulbrich, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **70/71** (1993) 157
56. L. W. Seymour, K. Ulbrich, S. R. Wedge, I. C. Hume, J. Strohalm, R. Duncan, *Br. J. Cancer* **63**(3) (1991) 859
57. M. V. Pimm, A. C. Perkins, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, *J. Drug Targeting* **3** (1996) 375
58. M. V. Pimm, A. C. Perkins, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, *J. Drug Targeting* **3** (1996) 385
59. P. A. Flanagan, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, *J. Controlled Release* **26** (1993) 221
60. L. W. Seymour, K. Ulbrich, P. S. Steyger, M. Brereton, V. Subr, J. Strohalm, R. Duncan, *Br. J. Cancer* **70**(4) (1994) 636
61. N. L. Krinick, B. Rihova, K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopeček, *Macromol. Chem.* **191** (1990) 839
62. J. Kopeček, B. Rihova, N. L. Krinick, *J. Controlled Release* **16** (1991) 137
63. M. V. Solovskij, K. Ulbrich, O. V. Nazarova, N. V. Zubko, E. F. Panarin, J. Kopeček, *Macromol. Chem.* **190** (1989) 2245
64. P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromol. Chem.* **191** (1990) 2037
65. J. Kopeček, P. Kopečková, H. Brondsted, R. Rath, B. Rihova, P.-Y. Yeh, K. Ikesue, *J. Controlled Release* **19** (1992) 121
66. P. Kopečková, R. Rath, S. Takada, B. Rihova, M. M. Berenson, J. Kopeček, *J. Controlled Release* **28** (1994) 211
67. Y. Grim, J. Kopeček, *New Polym. Mater.* **3**(1) (1991) 49
68. K. Ulbrich, V. Šubr, P. Podperova, M. Burešova, *J. Controlled Release* **34** (1995) 155
69. J. Vacik, K. Ulbrich, J. Exner, J. Kopeček, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **43** (1978) 1221

SUMMARY

Polymer-drug conjugates. III. Development of polyN-(2-hydroxypropyl)methacrylamide conjugates

Branka Zorc and Renata Banek

In this paper, synthesis of polyN-(2-hydroxypropyl)methacrylamide and related copolymers is reviewed, as well as HPMA copolymer-drug conjugates with numerous pharmacological active substances (proteins: insulin, trypsin, chymotrypsin, chymotrypsinogen, acetylcholineesterase, vaccines; antineoplastic agents: adriamycin, daunomycin, puromycin, melphalan, sarkolysine, doxorubicin, photoactivatable drugs; 6-aminopenicillanic acid; anti-inflammatory agents: 5-aminosalicylic acid). A review of related biological testing required for estimation of potential application in pharmacy and medicine is given too. One of the conjugates, poly(HPMA) copolymer with doxorubicin has successfully passed the clinical trials and its approval as a drug is expected.

Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Received October 1, 1997
Accepted November 10, 1997